



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 15/82, A01H 5/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/22148 (43) Date de publication internationale: 20 avril 2000 (20.04.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02412 (22) Date de dépôt international: 8 octobre 1999 (08.10.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/12704 9 octobre 1998 (09.10.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIOGEMMA [FR/FR]; 1 Rue Edouard-Colonne, F-75001 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PAGNIEZ, Michel [FR/FR]; 7 Square Grenat, F-31820 Pibrac (FR). GRISON, René [FR/FR]; 13 Rue de Naurouze, F-31750 Escalquens (FR). TOPPAN, Alain [FR/FR]; 2 Rue de Crabinet, F-31700 Comebarrieu (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING TRANSGENIC PLANTS EXPRESSING A PROTEIN WITH ACTIVITY PRODUCING HYDROGEN PEROXIDE BY TRANSFORMATION BY AGROBACTERIUM RHIZOGENES		
(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES TRANSGENIQUES EXPRIMANT UNE PROTEINE A ACTIVITE PRODUCTRICE DE PEROXYDE D'HYDROGENE PAR TRANSFORMATION PAR AGROBACTERIUM RHIZOGENES		
(57) Abstract <p>The invention concerns a method for obtaining transgenic plants expressing a protein activity producing H₂O₂ comprising the following steps which consist in: (a) transforming plant cells with <i>Agrobacterium rhizogenes</i> containing a vector bearing a gene coding for a protein producing H₂O₂ in a context which enables its expression in the plant; (b) selecting transformants which contain and express said gene by a peroxidase colorimetric test; (c) regenerating the plants from selected roots and controlling the expression of the resulting plantlets by a peroxidase colorimetric test; (d) phenotypic screening and optionally molecular analysis of the transgenic plants progeny, enabling to select and confirm the resulting transgenic plants containing only the transgene and not the T-DNA belonging to the <i>Agrobacterium rhizogenes</i>. The invention is useful for obtaining transgenic plants.</p>		
(57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un procédé pour l'obtention de plantes transgéniques exprimant une protéine à activité productrice de H₂O₂, qui comprend les étapes suivantes de: (a) transformation de cellules végétales par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> contenant un vecteur porteur d'un gène codant pour une protéine productrice de H₂O₂ dans un contexte qui permet son expression dans le végétal; (b) sélection des transformants qui contiennent et expriment ce gène par un test colorimétrique à la peroxydase; (c) régénération des plantes à partir des racines sélectionnées et contrôle de l'expression des plantules obtenues par un test colorimétrique à la peroxydase; (d) tri phénotypique et éventuellement analyse moléculaire de la descendance des plantes transgéniques, permettant la sélection ou la confirmation des plantes transgéniques obtenues contenant seulement le transgène et non l'ADN-T propre à <i>A. rhizogenes</i>. Application: obtention de plantes transgéniques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Procédé d'obtention de plantes transgéniques exprimant une protéine à activité productrice de peroxyde d'hydrogène par transformation par *Agrobacterium rhizogenes*

5 L'invention concerne le domaine de la transformation génétique des plantes par *Agrobacterium rhizogenes*, combinée à l'utilisation d'un gène codant pour une protéine à activité productrice de peroxyde d'hydrogène et notamment l'oxalate oxydase.

10 L'objet de la présente invention est un procédé d'obtention de plantes transgéniques, caractérisé en ce qu'il utilise une transformation par *Agrobacterium rhizogenes* associée à un tri visuel des événements de transformation, basé sur la coloration, simple à mettre en œuvre et rapide, des racines transformées exprimant le transgène.

15 Depuis que les premiers essais aux champs, donc hors confinement, de plantes transgéniques ont eu lieu en 1986, l'usage d'un gène de résistance à un antibiotique comme gène de sélection a fait l'objet de nombreuses critiques (Casse-Delbart et Tepfer, Biofutur, (1990), Juin ; 56-59, ainsi que Bryant et Leather, Tibtech, (1992), 10, 274-275). Bien que les possibilités d'une transmission de gènes de la plante transgénique à des bactéries du sol n'aient pas
20 été mises en évidence, l'utilisation de gènes de résistance à des antibiotiques est très mal perçue par certains auteurs (Heinemann, TIG, (1991), 7, 181-185).

De nombreux substituts au gène de résistance à la kanamycine ont été proposés (Ratner, Bio-Technology, (1989), 7, 337-341) mais la plupart de ces gènes de résistance à un autre antibiotique ou à un herbicide, conduisent à des
25 objections semblables ou à des difficultés techniques de mise en œuvre.

L'utilisation de l'oxalate oxydase comme gène de sélection offre une alternative aux systèmes précédents. Mise en évidence chez certaines plantes, cette protéine est capable de dégrader l'acide oxalique, qui est une phytotoxine produite lors de l'infection par de nombreux pathogènes de plantes.

30 Une première application de l'oxalate oxydase a été la production de plantes transgéniques résistantes aux pathogènes du genre *Sclerotinia* (WO 92/14824).

La demande de brevet WO 94/13790 décrit une nouvelle utilisation de l'oxalate oxydase en remplacement de la kanamycine, dans un système de pression sélective des transformants. Selon le procédé décrit dans WO 94/13790, seuls les transformants (cals) contenant le gène de l'oxalate oxydase, survivent à une dose
5 subléthale déterminée d'acide oxalique, présente dans le milieu. Mais la préparation des milieux de sélection (dose d'acide oxalique, chélateurs de calcium) est lourde et contraignante.

Jusqu'ici, l'oxalate oxydase était utilisée couplée à l'agent toxique, l'acide oxalique, dans une perspective de pression sélective, alors que dans le
10 procédé de la présente demande il est utilisé comme simple marqueur pour un tri visuel des transformants. Pourtant, cette protéine ne semblait pas être *a priori* un bon candidat comme marqueur, puisqu'elle était fortement exprimée chez des plantes infectées par un pathogène, d'où un risque important de fausser les résultats (faux positifs, par exemple). De plus, l'enseignement de la demande de
15 brevet WO 94/13790 n'encourageait pas l'homme du métier à utiliser un test colorimétrique pour la sélection des transformants, puisqu'un tel test permet de sélectionner des événements individualisés (cellules transformées) et non des événements éparpillés dans un matériel hétérogène comme le cal, issu de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* et contenant en mélange des
20 cellules transformées et des cellules non-transformées.

La présente invention propose donc un procédé d'obtention de plantes transgéniques, avantageux en ce qu'il supprime les contraintes techniques du procédé sus-décrit par la combinaison des caractéristiques d'*Agrobacterium rhizogenes* et d'une protéine à activité productrice de H_2O_2 . En particulier, les
25 inventeurs exploitent la formation de racines induite par *Agrobacterium rhizogenes* et le phénotype des transformants (feuilles gaufrées, racines plagiotropes, entre-nœuds raccourcis) en association avec la production de H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) par la protéine pour la mise au point d'un nouveau système de sélection de transformants homogènes. Dans ce système le peroxyde
30 d'hydrogène produit est révélé en présence de peroxydase, pour produire une coloration des échantillons de racines transformées.

Selon un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé d'obtention de plantes transgéniques qui comprend les étapes suivantes de :

(a) transformation de cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes* contenant un vecteur porteur d'un gène codant pour une protéine à activité productrice de H_2O_2 ;

(b) sélection des transformants qui contiennent et expriment ce gène par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(c) régénération des plantes à partir des racines sélectionnées et contrôle de l'expression des plantules obtenues par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(d) tri selon leur phénotype et éventuellement validation par analyse moléculaire de la descendance des plantes transgéniques obtenues, permettant la sélection ou la confirmation de plantes contenant seulement le transgène et non l'ADN-T propre à *Agrobacterium rhizogenes*.

Le test colorimétrique à la peroxydase mis en œuvre dans les étapes b) et c) du procédé de l'invention consiste à incuber un échantillon de tissus végétaux prélevés en présence d'un milieu contenant un substrat de la protéine à activité productrice de H_2O_2 , tel que par exemple l'acide oxalique et à relever la formation de H_2O_2 à l'aide de la peroxydase en présence d'un substrat approprié dont l'oxydation s'accompagne d'un changement de coloration. La concentration en substrat dans le milieu d'incubation n'est pas critique puisque le système de tri visuel sur échantillon selon la présente invention ne requiert pas la survie des cellules, alors que c'est le cas pour le tri sélectif "vital" des cellules transformées décrit dans la demande WO 94/13790. Dans le cas présent, la concentration en substrat est avantageusement une concentration saturante pour que l'activité productrice de H_2O_2 soit favorisée et les produits facilement révélés à la peroxydase, sous forme d'une coloration bleue soutenue. L'enseignement de la demande WO 94/13790 n'indique pas l'utilisation de concentration en acide oxalique supérieure à la dose subléthale exemplifiée, qui est de 3mM ; or il s'avère que les concentrations optimales de substrat pour le tri visuel sont bien supérieures à cette concentration critique. A titre d'exemple, les concentrations

d'acide oxalique peuvent être comprises dans une large gamme allant de 5 à 50mM et préférentiellement de 10 à 20 mM, en particulier 15 mM.

Le test colorimétrique effectué à l'étape b) du procédé est avantageusement réalisé sur un échantillon de la racine. Il peut également être
5 effectué sur le milieu liquide d'incubation avantageusement après décontamination des explants (élimination des agrobactéries), sachant que la protéine, telle que l'oxalate oxydase, peut diffuser à partir du lieu où elle est exprimée. De même, une révélation sur empreinte laissée par les explants transformés sur un milieu gélosé ou sur une membrane, est également possible.

10 Le test colorimétrique effectué à l'étape c) du procédé peut être effectué sur un échantillon de tissu végétal des plantes régénérées.

Selon l'invention, les cellules végétales sont transformées par *Agrobacterium rhizogenes* contenant un ADN recombinant comprenant un gène codant pour une protéine à activité productrice de H₂O₂ dans un contexte qui
15 permet son expression dans le végétal. *Agrobacterium rhizogenes*, qui est décrite par exemple par Tepfer, Physiologica Plantarum, (1990), vol. 79 p. 140-146, est une bactérie susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration, dans le génome de ces dernières, des séquences d'ADN d'intérêt initialement contenues dans l'ADN-T d'*Agrobacterium rhizogenes*. En fait, la
20 transformation des cellules végétales utilise un système binaire (Watson in Genetic engineering of crop plants, Butterworths, 1990) comprenant deux vecteurs : le premier étant le pRi propre à *Agrobacterium rhizogenes* et responsable de la formation des racines transformées ; le second vecteur, de type binaire (Bevan, Nuc. Acid. Res. (1984), 12 : 8711), contient le gène codant pour la
25 protéine à activité productrice de H₂O₂ et préférentiellement pour l'oxalate oxydase ; ce gène sera dénommé ci-après gène de sélection.

La protéine codée par le gène de sélection est une protéine à activité productrice de H₂O₂. A titre d'exemples de telles protéines, on peut citer les NADPH oxydases, oxalate oxydases, amines oxydases, glucose oxydases, etc.
30 (Bolwell et Wojtazek, Plant Mol. Plant Pathol., (1998), 51, 347). Les gènes codant pour ces protéines peuvent être utilisés aux fins de l'invention.

De préférence, on utilisera un gène codant pour une protéine à activité oxydase, telle que par exemple l'oxalate oxydase d'orge (commercialisée par Boehringer, réf. 567698), de sorgho (Pundier, Phytochemistry, (1991), 30, 4, 1065) ou de mousse *Mnium menziesii* (Laker et al, Clinical Chemistry, (1980), 26, 7, 827).

Une protéine à activité oxalate oxydase particulièrement appréciée est la germinine de blé, dont la séquence a été décrite par Dratewka-Kos, J. Biol. Chem, (1989), 264, 4896) et Lane, J. Biol. Chem.(1991), 266, 10461). Compte tenu de la dégénérescence du code génétique, il existe un grand nombre de séquences nucléotidiques codant pour l'oxalate oxydase, qui peuvent être également utilisées aux fins de l'invention.

L'ADN recombinant comprend le gène codant pour la protéine à activité productrice de H_2O_2 , flanqué des moyens nécessaires à son expression, notamment un promoteur, un terminateur de transcription, et éventuellement une séquence codant pour un peptide d'adressage d'origine végétale.

Le promoteur est de préférence un promoteur constitutif fort, par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur.

De façon alternative, on peut utiliser le promoteur du gène codant pour le facteur d'élongation de plante, tel que le promoteur EF-1 α décrit dans la demande de brevet WO 90/02172 ou par Axelos et al. Plant Mol. Biol., (1989), 219 : 1-2, 106. On peut également utiliser un promoteur spécifique d'un tissu, un promoteur actif au cours d'un stade précis du développement de la plante, ou un promoteur inductible dans des situations de stress, par exemple à la suite d'un choc thermique, d'une blessure ou de l'interaction entre la plante et des parasites (Kuhlemeier et al., Ann. Rev. Plant Physiol., (1987), 38 : 221), si la phase de sélection nécessite l'expression du gène producteur de H_2O_2 dans ces situations.

Parmi les autres promoteurs de transcription pouvant être utilisés, on peut citer notamment :

- le promoteur constitutif double 35S (pd35S) du CaMV, décrit dans l'article de Kay et al., Science, (1987), 236 : 4805 ;

- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M et al., Plant J.,(1995), 7: 661) constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* ;

- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par Mc Elroy et al., (Mol. Gen. Genet., (1991), 231 : 150) ;

10 On peut également utiliser des promoteurs spécifiques de la graine, notamment :

- le promoteur HMGW (High Molecular Weight Glutenine) d'orge décrit par Anderson et al., T.A.G., (1989), 77, 689-700 ;

- le promoteur du gène de γ -zéine de maïs (Py-zéine) contenu dans le plasmide py63, et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs, décrit par Reina et al., Nucleic Acid Research, (1990), 18, 6426 ;

- le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des séquences associées uniquement dans les semences (ou graines) de la plante transgénique obtenue ; ce promoteur est décrit par Depigny-This et al., Plant. Mol., Biol., (1992), 20, 467-479 ;

- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier et al., Mol. Gen. Genet (1993), 238, p.409-418, et permettant une expression spécifique dans les graines ;

25 On utilise une séquence terminatrice, comportant des sites de polyadénylation, pouvant être isolée de gènes végétaux ou de gènes s'exprimant dans les végétaux, comme par exemple le terminateur du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet (1982), 1, 561-573).

30 Parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage d'origine végétale, pouvant être utilisées dans le cadre de l'invention, on peut citer :

- la séquence nucléotidique de 69 nucléotides codant pour le prépeptide (peptide signal) de 23 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, permettant l'entrée des polypeptides recombinants dans le système de sécrétion des cellules végétales transformées ;

5 - la séquence nucléotidique de 42 nucléotides codant pour le propeptide N-terminal d'adressage vacuolaire de 14 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, permettant l'accumulation des polypeptides recombinants dans les vacuoles des cellules végétales transformées ;

10 - la séquence de 111 nucléotides codant pour le prépropeptide de 37 acides aminés de la sporamine A constitué depuis l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale des 23 acides aminés du peptide signal susmentionné suivis par les 14 acides aminés du propeptide susmentionné, ce prépropeptide permettant l'entrée de polypeptides recombinants dans le système de sécrétion et leur accumulation dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon
15 l'invention,
les trois séquences susmentionnées étant décrites par Murakami et al., Plant Mol. Biol., (1986), 7, 343-355 et par Matsuoka et al. dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1991), 88, 834-838.

20 - le propeptide carboxyterminal de la lectine d'orge décrit notamment par Schroeder et al. dans Plant Physiol., (1993), 101, 451-458 et par Bednarek et al., dans The Plant Cell, (1991), 3, 1195-1206 ;

 - et le PRS (Pathogenesis Related Protein) de Cornelissen et al. Nature, (1986), 321, 531-532 permettant la sécrétion.

25 On peut également citer, parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage, celles codant pour les peptides Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) ; Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu (SEKDEL) ; et His-Asp-Glu-Leu (HDEL) et permettant un adressage dans le réticulum endoplasmique.

30 Une bactérie, par exemple de l'espèce *Escherichia coli*, qui contient l'ADN recombinant défini ci-dessus avec les moyens permettant sa répllication peut servir au clonage de cet ADN recombinant. Une bactérie susceptible d'infecter une plante avec transfert de matériel génétique, *Agrobacterium*

rhizogenes, qui contient cet ADN dans un contexte permettant sa réplication, servira à transformer des cellules végétales.

L'invention concerne également une cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par l'ADN recombinant défini précédemment. Cette
5 cellule végétale peut provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, le blé, l'orge, le colza, le tournesol et le pois ou d'une espèce potagère, telle que la laitue, le melon, la tomate, les choux, l'oignon et le maïs, maïs doux de préférence. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza *Brassica napus*, le tournesol *Helianthus annuus*, le tabac *Nicotiana*
10 *tabacum*, le chou fleur *Brassica oleracea* et la tomate *Lycopersicon esculentum*. De préférence, l'invention concerne des espèces qui n'expriment pas l'oxalate oxydase de façon endogène.

L'invention concerne aussi une plante ou partie de plante, caractérisée en ce qu'elle contient l'ADN recombinant défini précédemment et en ce qu'elle a été
15 sélectionnée par visualisation de l'activité enzymatique de la protéine à activité productrice de H_2O_2 par utilisation d'un test colorimétrique à la peroxydase, appliqué aux racines issues de culture in vitro ou aux tissus végétaux prélevés sur les plantes entières. Les plantes transgéniques sont régénérées directement à partir des racines ou organes sélectionnés par le test colorimétrique à la peroxydase.

20 Les parties de plantes définies selon l'invention comprennent notamment les hypocotyles, hampes de fleurs, pétioles et préférentiellement les cotylédons. Par partie de plantes, on entend également les cellules cultivées in vitro ou les cellules de ladite plante.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence d'ADN recombinant
25 codant pour une protéine à activité productrice de H_2O_2 est utilisée pour sélectionner des cellules végétales transformées avec une séquence d'intérêt.

Ainsi l'invention concerne également un procédé pour l'obtention de plantes transgéniques exprimant un gène d'intérêt, autre que celui de la protéine à activité productrice de H_2O_2 , associé au gène codant pour une protéine productrice
30 de H_2O_2 , qui comprend les étapes suivantes de :

(a) transformation de cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes* contenant un ADN recombinant comprenant à la fois un gène codant la protéine productrice de H₂O₂ et un gène codant pour une protéine d'intérêt dans un contexte permettant leur expression dans le végétal ;

5 (b) sélection des transformants qui contiennent le gène codant pour la protéine d'intérêt par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(c) régénération de plantes à partir des transformants sélectionnés et contrôle de l'expression des plantules obtenues par un test colorimétrique à la peroxydase ;

10 (d) tri selon le phénotype et éventuellement analyse moléculaire de la descendance des plantes transgéniques pour sélectionner ou confirmer les plantes contenant seulement le transgène et non l'ADN-T propre à *A. rhizogenes*.

(e) purification, le cas échéant de la protéine d'intérêt produite.

Ce nouveau système de révélation immédiat sur racine est
15 particulièrement intéressant dans le cas où le gène d'intérêt est exprimé à un stade tardif du développement ou dans autre organe végétatif que celui sur lequel est effectué la sélection ou encore s'il est difficile à mettre en évidence. Il est par exemple utilisable pour sélectionner des événements de transformation portant sur un gène d'intérêt placé sous contrôle d'un promoteur spécifique de la graine ou
20 spécifiquement exprimé dans les tissus verts.

La séquence d'intérêt peut être toute séquence d'ADN d'intérêt agronomique ou industriel. Par exemple, elle peut être impliquée dans une voie métabolique donnée, notamment celle des huiles, des amidons, des protéines, des
25 acides aminés, de la lignine, des composants de la paroi cellulaire ou encore dans la voie de résistance aux pathogènes. Cette séquence d'intérêt peut encore être utilisée en sens ou en antisens.

Elle peut également être, par exemple, une séquence régulatrice avantageuse. Elle peut être aussi une séquence codant pour une protéine d'intérêt ou pour un précurseur de cette dernière. A titre d'exemple de séquences codant
30 pour une protéine d'intérêt, on peut citer les séquences codant pour les lipases.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la séquence d'intérêt confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes, tels que les champignons, les bactéries, ainsi que les arthropodes, notamment les insectes, et les nématodes.

5 Une telle séquence d'intérêt peut être, par exemple, une séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière. On sait en effet, comme décrit dans la demande de brevet WO 92/01792, qu'une telle protéine a un effet phytoprotecteur car elle est capable de dégrader la chitine, polymère polysaccharidique constitué d'unités N-acétyl-glucosamine associées par
10 des liaisons β -1,4, qui est un composé structural important de la paroi de la plupart des champignons pathogènes, de l'exosquelette des arthropodes, en particulier des insectes, et de l'enveloppe externe des œufs et des cystes de nématodes.

Une séquence intéressante codant pour une protéine à activité
15 endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière, est celle décrite dans la demande de brevet WO 92/01792, incorporée par référence.

Une autre séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière est celle de la chitinase d'*Aphanocladium album* décrite dans la demande de brevet EP-A1-531 218, incorporée par
20 référence.

L'invention concerne également les cellules végétales, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par l'ADN recombinant défini précédemment, à savoir l'ADN recombinant comprenant un gène codant pour une protéine à activité productrice de H_2O_2 et un gène codant pour une protéine d'intérêt ainsi que les
25 moyens nécessaires à leur expression. Lesdits moyens sont les mêmes que ceux définis précédemment. Ces cellules végétales peuvent provenir des espèces de grande culture ou des espèces potagères précédemment indiquées.

L'invention concerne aussi une plante ou partie de plante, caractérisée en ce qu'elle exprime la protéine d'intérêt sus-décrite, avec les moyens nécessaires à
30 l'expression du gène codant pour une protéine capable de produire H_2O_2 et notamment l'oxalate oxydase. Cette plante ou partie de plante est sélectionnée par

un test colorimétrique de révélation de H_2O_2 formé sur les racines issues de culture in vitro ou de plantes en serre. Les plantes transgéniques sont régénérées directement à partir des racines exprimant le transgène qui sont sélectionnées par le test colorimétrique.

5 Les parties de plantes sont telles que définies précédemment.

L'invention sera illustrée à l'aide des exemples décrits ci-après.

Dans cette partie expérimentale, on utilise le clone gf-2.8 de la germine de blé décrite par Lane et al., J. Biol. Chem., (1991), 226, 10461.

10 Une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme du métier, est exposée en détail dans les ouvrages de Sambrook et al. : « Molecular Cloning : a Laboratory Manual », publié en 1989 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New York (2^{ème} édition), et dans l'ouvrage de Gelvin et al. : « Plant Molecular Biology Manual », publié en 1988 par les éditions Kluwer Academics.

15 EXEMPLES

Exemple 1 : Transformation de plantes par le gène de la germine de blé et sélection des transformants par un test colorimétrique sur racine

1-1 Obtention de colza transgénique

a) Vecteurs de transformation

20 Selon un premier mode de réalisation de l'invention, la séquence codant pour la germine de blé est liguée à la séquence promotrice 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et à la séquence terminatrice NOS d'*Agrobacterium tumefaciens*, avant d'être insérée dans le vecteur binaire pBIN19 (Bevan, Nucl. Acid, Res., (1984), 12, 8711-8721) selon le mode opératoire décrit à la Section 2
25 de la demande WO94/13790, incorporée par référence. Le vecteur obtenu, nommé pPH100, est cloné dans la souche *E. coli* HB101 (Clontech).

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, on a opéré de la même manière que ci-dessus en utilisant la séquence promotrice du gène codant pour le promoteur du Facteur d'Elongation EF-1 α isolé d'*Arabidopsis thaliana* (Axelos et
30 al, Plant Mol Biol, (1989), 219 :1-2,106) à la place de la séquence promotrice 35S. Le nouveau vecteur, nommé p631, est cloné dans la souche *E. coli* HB 101.

La séquence promotrice peut aussi être la séquence promotrice inductible décrite dans la demande de brevet WO94/21793 et portée par le vecteur pPH118 décrit à l'exemple 3 ci-après.

b) Transfert dans *Agrobacterium rhizogenes*

5 Le transfert des plasmides sus-décrits est réalisé selon la méthode de congélation-décongélation décrite par Gelvin et al. dans Plant Molecular Biology Manual susmentionné, avec la souche *Agrobacterium rhizogenes* A4 décrite par Guerche et al. dans Mol. Gen. Genet., (1987), 206, 382.

10 Les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant 100 mg/l de rifampicine et 25 mg/l de kanamycine. Les colonies qui se forment alors sont repiquées plusieurs fois sur le milieu de sélection. La présence du gène d'oxalate oxydase dans *Agrobacterium rhizogenes* est vérifiée par la méthode de Southern, sur une préparation d'ADN total (lyse des bactéries, purification de l'ADN par extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme selon le protocole décrit par

15 Gelvin dans l'ouvrage cité ci-dessus, coupure de l'ADN purifié à l'aide d'enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur membrane et hybridation selon les techniques bien connues de l'homme du métier.

c) Obtention de racines transformées et sélection

La transformation est réalisée selon le protocole de Guerche et al (1987)

20 et les différents milieux de culture, dont la composition est présentée dans le tableau 1 ci-après, sont ceux décrits par Pelletier et al. (Mol. Gen. Genet., (1983) 191, 244).

Des segments de tige sont prélevés sur l'extrémité apicale de plantes de colza (*Brassica napus* : variétés de printemps Brutor et variétés d'hiver Nickel ou

25 Navajo). Ces segments sont stérilisés en surface, rincés dans de l'eau stérile, découpés en segments de 1,5 cm de long environ et placés dans un tube contenant le milieu A. Alternativement, l'explant utilisé pour la transformation peut être constitué par des cotylédons prélevés sur de jeunes germinations de huit jours environ. L'inoculation de l'extrémité des segments de hampes, des hypocotyles ou

30 des pétioles de cotylédons est effectuée par dépôt d'une suspension de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* contenant le vecteur pPH100 ou le vecteur p631. Des

racines transformées apparaissent sur le segment de tige ou sur les pétioles de cotylédons au bout de 1 à 2 semaines, elles sont prélevées au bout de 3 semaines et placées sur le milieu *B* gélosé (15 g/l). Ces racines contiennent l'ADN-T du vecteur pRi propre à *Agrobacterium rhizogenes* seul ou accompagné de l'ADN-T du vecteur porteur du gène codant pour l'oxalate oxydase.

La sélection des transformants contenant l'ADN-T des plasmides pPH100 ou p631 porteurs du gène codant pour la germinine de blé, est réalisée selon le protocole suivant :

- la première étape consiste à prélever au scalpel les extrémités apicales (0,5 à 1 cm) de racines cultivées in vitro de préférence (stade décontamination ou culture liquide) ou de fragments de feuilles de plantes cultivées en serre, et les introduire dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 0,5 ml de mélange réactionnel « oxalate oxydase » (oxalate de Na 0,015 M dans un tampon succinate pH 4 ; 0,05 M). Les tubes contenant les racines sont conservés dans la glace jusqu'à la fin du prélèvement.

- la seconde étape est l'incubation des tubes au bain-marie à 37°C pendant 1 heure, conditions permettant le déroulement de la réaction catalysée par l'oxalate oxydase.

- la troisième et dernière étape est la révélation de l'eau oxygénée produite dans l'étape précédente : sont ajoutés successivement au mélange réactionnel un substrat dont l'oxydation s'accompagne d'un changement de coloration ; ce substrat est choisi parmi les composés phénoliques ou les amines aromatiques et, par exemple, 0,1 ml de 4-chloro-1-naphtol à 0,3 % dans l'éthanol absolu et 0,1 ml de peroxydase à 0,006 % dans le tampon Tris pH 7,6, 50 mM. Les tubes sont agités puis incubés au moins 2 heures au bain-marie à 37°C. Une coloration bleue est obtenue sur les racines transformées, préférentiellement au niveau de la partie apicale et du cylindre central des racines. Ce test coloré sur échantillon de racine permet la détection des transformants qui ont intégré et expriment le gène d'oxalate oxydase.

Les solutions des produits utilisés sont décrites ci-après :

Tampon Succinate 0,05M, pH4, QSP 250 ml (conserver à 4°C, 3 semaines maximum)

3,375 g de Succinate de Na, ajuster à pH4 avec HCl

5 Mélange réactionnel « oxalate-oxydase » (préparer extemporanément)

18 mg d'oxalate de Na dans 10 ml de Tampon Succinate

Solution mère de 4-Chloro-1-Naphtol (conserver à 4°C)

0,3 g/10 ml éthanol absolu

Solution d'utilisation de 4-Chloro-1-Naphtol (préparer extemporanément)

10 0,1 ml solution mère/10 ml Tris 50 mM ; pH 7,6

Tampon Tris 50 mM ; pH 7,6 QSP 250 ml (conserver à 4°C)

1,96 g Tris-HCl, ajuster à pH 7,6 avec NaOH

Peroxydase (aliquoter et congeler à -20°C)

6 mg/100 ml tampon Tris 50 mM ; pH 7,6

15 d) Régénération de plantes transformées et tri phénotypique

Des fragments de racines sélectionnées sont incubés pendant 15 jours sur le milieu D contenant 3 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, puis placés sur un milieu d'induction RCC de bourgeons. Les plantes racinées sont ensuite obtenues par passages des bourgeons sur les milieux F et G. Les plantes sont
20 cultivées et auto fécondées pour donner des graines. L'expression des plantes régénérées obtenues peut être facilement contrôlée par des techniques simples (squash, empreinte, dot ou coloration directe sur des fragments de feuilles, de tiges, ...). Un tri de la descendance selon les caractères phénotypiques des plantes transformées permet d'éliminer les plantes contenant l'ADN-T de pRi, qui
25 présentent notamment des feuilles gaufrées et des entre-nœuds raccourcis. Ce tri est ensuite confirmé par des méthodes d'analyse moléculaire.

1-2 Obtention de chou-fleur transgénique

Selon le même protocole, des segments de tige sont prélevés sur de jeunes fleurs de *Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* cv. Taroke et transformées via
30 les souches d'*Agrobacterium rhizogenes* A4 précitées. Les racines exprimant le gène codant pour l'oxalate oxydase sont sélectionnées selon le test coloré décrit et

mises à régénérer pour l'obtention de plantes transgéniques. Les plantes régénérées obtenues sont cultivées en serre, vernalisées puis auto fécondées et leur descendance triée sur la base de caractères phénotypiques et d'analyses moléculaires pour ne conserver que les plantes qui contiennent uniquement
5 l'ADN-T porteur du gène d'oxalate oxydase.

1-3 Obtention de cals de tournesol transgéniques

Des segments de pétioles sont prélevés sur des plantes de tournesol *Helianthus annuus* (Variété Euroflor Rustica Prograin Génétique) âgées de 6 à 10 semaines. Les segments sont désinfectés par trempage pendant 30 minutes dans
10 une solution d'hypochlorite de calcium à 1%. Les segments de pétioles sont ensuite placés dans un tube contenant du milieu de culture de Murashige et Skoog gélosé. L'inoculation de l'extrémité de ces segments est effectuée par dépôt d'une suspension de la souche d'*Agrobacterium rhizogenes* contenant le plasmide pPH100. Des racines transformées apparaissent ensuite sur le segment de pétiole
15 au bout de 1 mois environ. Ces racines sont prélevées et placées sur le milieu *M* gélosé (Tableau 2, en annexe) additionné de 6g/l d'agarose.

Une sélection des racines exprimant la protéine à activité oxalate oxydase est effectuée au stade racine selon le protocole précédemment décrit. Les racines positives au test colorimétrique, sont alors repiquées sur le même milieu, donnant
20 des cals entièrement transformés qui expriment l'oxalate oxydase.

1-4 Obtention de tabac transgénique

La nervure centrale de feuilles de tabac est découpée en fragments qui sont placés sur un milieu de Murashige et Skoog (MS) gélosé. Ces explants sont inoculés à l'aide d'une suspension de la souche *A. rhizogenes* contenant le
25 plasmide pPH100. Les racines qui apparaissent au bout de quelques jours sont repiquées sur le même milieu contenant 500 mg/l de cefotaxime afin d'éliminer la bactérie et transférées ensuite sur un milieu gélosé de Murashige et Skoog contenant 0,1 mg/l d'AIA (acide 3-indolyl acétique) et 1 mg/l de BAP (6-benzyl aminopurine). Les bourgeons qui se forment sont repiqués sur un milieu MS
30 gélosé et les plantes obtenues transférées en serre.

1-5 Obtention de tomate transgénique

Des plantes de tomate peuvent être obtenues selon le même protocole de transformation et sélection, à partir de racines de plantes transformées (Shahin et al, TAG (1986) 72 :770 ; Morgan et al, Plant Science (1987), 49 :37).

5

Exemple 2 : Utilisation de ce procédé de sélection à la peroxydase pour obtenir des plantes transgéniques exprimant un second gène d'intérêt : le gène codant pour une protéine à activité endochitinase.

10

2-1 Obtention de colza transgénique

Le vecteur de transformation pPH106, comprenant le gène codant pour la germinine de blé issu du plasmide pPH100 sus-décrit et le gène chimérique codant pour une activité endochitinase (WO 92/01792), est obtenu selon le procédé décrit dans la demande de brevet WO 94/13790, incorporée par référence.

15

La préparation du vecteur de transformation comprend les étapes suivantes :

a) préparation du fragment portant le gène codant pour l'oxalate oxydase

Le fragment HindIII-EcoRI de 1420 pb environ du plasmide pPH100 cité dans la section 1-1 de l'exemple 1 est purifié et recloné dans un vecteur pUC19 selon les méthodes bien connues de l'homme du métier. Ce plasmide est ensuite linéarisé grâce à l'endonucléase de restriction EcoRI et l'extrémité cohésive est remplie au moyen du fragment de Klenow. Puis, après coupure par l'endonucléase HindIII, le fragment HindIII- extrémité franche est purifié.

20

b) préparation du fragment portant un gène hybride codant pour une protéine à activité endochitinase

25

Le fragment HindIII-EcoRI provenant du plasmide pBR1 décrit dans la demande de brevet WO 92/01792 exemple 1, incorporée par référence, et contenant un gène chimérique codant pour une protéine à activité endochitinase qui comprend le promoteur 35S, une séquence codant pour une chitinase hybride tomate-tabac et le terminateur NOS est purifié, recloné dans le vecteur pUC19,

30

puis le site HindIII est détruit d'une manière classique. Le fragment extrémité franche- EcoRI est purifié.

c) préparation d'un vecteur de transformation des plantes ne comportant pas de gène de résistance à la kanamycine

5 Le fragment NheI-HindIII comprenant la partie codant pour le gène de résistance à la kanamycine est éliminé de l'ADN-T du plasmide pBIN19. L'utilisation, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier, des oligonucléotides CTAGCA et AGCTTG, permet de recirculariser le plasmide en recréant les sites de restriction NheI et HindIII. Le plasmide résultant est ensuite
10 linéarisé par les endonucléases de restriction HindIII et EcoRI.

d) assemblage du vecteur de transformation

On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 le gène codant pour l'oxalate oxydase obtenu en a) ci-dessus et le gène chimérique codant pour une protéine à activité chitinase (obtenu en b) ci-dessus) dans un vecteur binaire pBIN19 dans
15 lequel on a éliminé le gène de résistance à la kanamycine s'exprimant dans les plantes (obtenu en c) ci-dessus). Le vecteur obtenu, appelé pPH106, est cloné dans la souche E. Coli HB101 (Clontech).

Les étapes de transformation, sélection et régénération sont réalisées selon le protocole fourni dans le premier exemple.

20 **2-2 Mise en évidence de l'expression de la protéine d'intérêt dans les plantes transgéniques régénérées**

Ainsi qu'il est décrit dans la demande de brevet WO 94/13790, incorporée par référence, des techniques de Western blot et de mesure de l'activité chitinolytique sur des extraits bruts de protéines de plantes transformées,
25 permettent de confirmer l'expression corrélée de l'endochitinase avec celle de l'oxalate oxydase.

La préparation des extraits bruts de protéines de plantes transformées est effectuée selon la méthode suivante : les fragments de tissus (cals et feuilles de plantes) ont été congelés dans l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à
30 -20°C.

Pour la réalisation d'électrophorèses, l'oxalate oxydase est extraite directement à partir de la poudre végétale par le tampon de charge de Laemmli (réf. ci-après).

Pour les dosages d'activité oxalate oxydase, l'extrait enzymatique est
5 réalisé par mise en suspension de la poudre végétale dans un tampon succinate 0,05 M, pH 4.

Pour les dosages de protéines, l'extrait végétal, en suspension dans le tampon succinate ci-dessus, est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min.

La concentration des protéines totales est déterminée sur les surnageants,
10 appelés ci-après les extraits bruts de protéines, en suivant la technique de Bradford, Anal. Biochem., (1976), 72, 248-254).

Les expériences de Western blot ou de mise en évidence de l'activité chitinolytique suivent les protocoles suivants :

a) Immunodétection de la chitinase hybride (Western blot)

15 On soumet les extraits bruts de protéines à un Western blot, technique bien connue de l'homme du métier et décrite par Towbin et al. (Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, (1979), 76, 4350-4354), qui comprend notamment les étapes suivantes :

- dénaturation par chauffage à 100°C pendant 10 min dans un tampon, dénommé tampon de charge, constitué de Tris 0,125M, pH6,8, SDS 4%, bleu de
20 bromophénol 0,002%, glycérol 20%, β -mercaptoéthanol 10% (selon le protocole décrit par Laemmli U.K, Nature, (1970), 227, 680-685), suivie d'une centrifugation à 10 000g ;

- séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisé selon le protocole décrit par Laemmli ;

25 - électrotransfert desdites protéines contenues dans le gel sur une membrane en PVDF (selon la technique de Towbin et al., réf. ci-dessus).

L'immunodétection est réalisée selon le protocole qui comprend les étapes suivantes :

- saturation de la membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène) sur
30 laquelle les protéines ont été transférées par incubation pendant au minimum 2 h à

37 °C dans une solution de gélatine à 3% dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % de détergent Tween 20.

- incubation (pendant 1 h à 37 °C) en présence de l'immunsérum préparé précédemment (contenant les anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine recombinante), dilué au 1/10 000 dans du tampon phosphate salin.

- 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05% de détergent Tween 20.

L'immunodétection de la protéine d'intérêt est réalisée grâce à un immunsérum contenant des anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine hybride à activité chitinase (cf. WO 92/01792 exemple 5, incorporé par référence).

Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham (« Blotting detection kit »), utilisé selon les indications du fabricant.

L'empreinte obtenue montre, pour les feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pPH106, la présence d'une protéine de poids moléculaire apparent d'environ 26 ± 6 kDa reconnue par les anticorps polyclonaux et absente des feuilles des plantes témoins. Cette protéine a le même poids moléculaire apparent que la protéine hybride à activité chitinase décrite dans la demande WO 92/01792.

b) Mise en évidence de l'activité chitinolytique de la protéine recombinante.

L'activité chitinolytique des extraits bruts de protéines de feuilles de plantes transformées par le plasmide pPH106 et d'extrait brut de protéines de feuilles de plantes non transformées, peut être mesurée selon la méthode suivante.

L'activité endochitinase de la protéine est mesurée par une méthode radiochimique permettant d'estimer la quantité de monomères ou d'oligomères libérés par l'enzyme à partir d'un substrat (la chitine tritiée). Cette méthode, décrite par Molano et al. Anal. Biochem., (1977), 83, 648-656), est résumée ci-après.

A un volume d'extrait protéique de 10 μ l sont ajoutés 50 μ l d'une suspension de chitine tritiée d'activité spécifique 0,58 MBq/ml. Le volume final est ajusté à 300 μ l avec du tampon d'acétate de sodium 0,2 M de pH 5,0.

Après 90 min d'incubation à 30°C, la réaction d'hydrolyse de la chitine est arrêtée
5 par 100 μ l d'acide trichloracétique à 20%. Les tubes réactionnels sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 12 000 g. Une partie aliquote de 100 μ l de surnageant renfermant les oligomères solubles de chitine est prélevée et la radioactivité correspondante est mesurée par scintillation liquide en présence de
10 5 ml de mélange scintillant. On exprime l'activité chitinolytique spécifique en dpm/ μ g de protéine.

On constate que les extraits de plantes transformés par le plasmide pPH106 ont une activité chitinolytique significativement supérieure à celle de l'extrait de plantes témoin. la sélection par test colorimétrique permet donc d'obtenir des plantes exprimant un gène d'intérêt, en l'occurrence le gène hybride
15 codant pour une protéine à activité chitinase décrit dans la demande de brevet WO 92/01792.

Une variante de l'ADN recombinant sus-décrit peut être obtenue en substituant le promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur par le promoteur du gène EF-1 α d'*Arabidopsis*, en amont de l'un ou des deux gènes
20 précédemment décrits.

Selon le même procédé, des plantes de chou-fleur, tournesol, tabac et tomate transgéniques peuvent être obtenues.

Exemple 3 : Utilisation et induction d'un promoteur inductible

25 Il est possible d'utiliser préférentiellement un promoteur inductible dans des situations de stress (par exemple choc thermique, blessure, choc hormonal, éliciteur biotique ou abiotique ou infection bactérienne, fongique ou virale), qui s'exprime à un niveau soutenu dans les différents organes et tissus d'un végétal, notamment les racines et la méristème d'une plante.

30 Dans cet exemple, on a utilisé le promoteur inductible au stress qui comprend la séquence d'ADN (séquence B précédée de la séquence C) [SEQ ID

N° 4 précédée de SEQ ID N°5] ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec cette séquence, telle que décrite dans la demande WO94/21793 incorporée par référence. Ce promoteur est dénommé ci-après p246-C.

3-1 Préparation des vecteurs de transformation

5 a) Construction promoteur inductible-oxalate oxydase

Le vecteur pPH100 décrit dans l'exemple 1-1 a) est ouvert à l'aide des enzymes de restriction HindIII et BamHI, puis le fragment de 13500 paires de bases environ correspondant à la partie codante de l'oxalate oxydase suivie du terminateur NOS dans le vecteur pBIN19, est purifié par électrophorèse sur gel
10 d'agarose.

Le vecteur pPH118 obtenu par insertion, selon les procédés bien connus de l'homme du métier, du promoteur inductible au stress p246-C défini ci-dessus dans le plasmide pTZ19R commercialisé par PHARMACIA, a été ouvert à l'aide des mêmes enzymes de restriction. Après une électrophorèse sur gel d'agarose, le
15 fragment HindIII-BamHI de 1275 pb environ est isolé et purifié. Il correspond à la séquence B précédée de la séquence C du promoteur inductible telle que décrites ci-dessus et dans la demande WO94/21793.

La ligation de la séquence promotrice ainsi obtenue au vecteur HindIII-BamHI ci-dessus met la partie codante de l'oxalate oxydase sous le contrôle du
20 promoteur inductible et du terminateur NOS ; le vecteur binaire ainsi créé est appelé p643. La construction de ce vecteur est illustrée sur la figure I annexée.

3-2 Transformation et sélection

La transformation du colza est réalisée selon le protocole décrit ci-dessus à l'exemple 1-1. Les racines transformées exprimant le gène d'oxalate oxydase
25 sont sélectionnées comme décrit précédemment et mises à régénérer. Après un choc hormonal, un cal se forme à partir des racines et produit des bourgeons qui sont ensuite repiqués pour donner des plantes. Ces plantes sont transférées en serre après une période d'acclimatation.

Selon ce même protocole des plantes de tabac, tomate et chou-fleur
30 peuvent être obtenues.

Exemple 4 : Sélection des transformants par un test colorimétrique sur milieu liquide ou empreinte de boîte de milieu gélosé ou membrane.

L'oxalate oxydase pouvant diffuser à partir du lieu où elle est exprimée, il est possible d'utiliser d'autres supports que la racine pour réaliser le test colorimétrique.

4-1. Milieu liquide

La sélection des transformants porteurs du gène codant pour la germine de blé peut être réalisée directement sur le milieu de culture in vitro après élimination des agrobactéries. Après avoir ôté les jeunes plantes décrites au point c) de l'exemple 1 § 1.1, on ajoute au milieu de culture ou à un échantillon prélevé de celui-ci, le mélange réactionnel "oxalate oxydase" puis l'on procède comme décrit à l'exemple 1 pour favoriser la réaction enzymatique et révéler les produits ainsi obtenus.

4-2. Empreinte sur membrane

a) Tri de jeunes plantes

Des graines de colza transgéniques obtenues selon l'exemple 1, §1.1, sont stérilisées en surface et mises à germer dans une boîte de matière plastique dont le fond est recouvert de plusieurs épaisseurs de papier filtre et d'une membrane en PVDF, Hybond C ou nitrate de cellulose, classiquement utilisées pour la réalisation de Western blots. Les graines sont disposées sur la membrane, sur une grille permettant de repérer leur position. La membrane est mouillée à l'aide d'eau stérile ; la boîte est ensuite fermée et placée dans une enceinte de culture pendant huit jours environ. Lorsque les racines des jeunes germinations sont longues de 1 à 2 cm, les plantules sont transférées dans une autre boîte, sur un papier filtre mouillé, en respectant la position qu'elles avaient sur la membrane.

La membrane est ensuite révélée selon une variante du protocole décrit à l'exemple 1 §1.1 :

- la membrane est mise à incuber à 37°C pendant une heure, après avoir été imbibée du mélange réactionnel « oxalate oxydase » (oxalate de Na 0,015 M dans un tampon succinate pH 4, 0,05M),

- la membrane est révélée par l'addition du substrat (composé phénolique ou amine aromatique) et par exemple de 4-chloro-1-naphtol à 0,03% dans l'éthanol absolu et une solution de peroxydase à 0,0006 % dans le tampon Tris-HCl pH 7,6 ; 50 mM. Cette révélation est poursuivie 2 heures à 37°C.
- 5 Les empreintes sur la membrane de racines de plantes exprimant l'oxalate oxydase se colorent en bleu, ce qui permet de repérer les transformants à conserver.

b) Tri sur empreintes réalisées à partir de coupes de tissus

Différents organes de plantes (feuilles, pétioles, racines, pièces florales...) transformées selon les étapes décrites à l'exemple 1, sont prélevés. Sur ces échantillons frais, une section est réalisée à l'aide d'un scalpel et la surface de coupe est fermement appliquée contre la surface d'une membrane de nitrocellulose. Après un séchage à l'air de quelques minutes, la révélation de la membrane est effectuée comme décrit ci-dessus.

10

15 Exemple 5 : Utilisation d'un promoteur spécifique de la graine.

Le système de révélation immédiat sur racine est particulièrement intéressant dans le cas où le gène d'intérêt est exprimé à un stade tardif du développement, comme dans la graine par exemple.

5-1 Préparation des vecteurs de transformation

Un premier vecteur contenant une séquence nucléique codant pour une lipase sous contrôle du promoteur PGEA1 d'*Arabidopsis thaliana*, spécifique de la graine (Gaubier et al., 1993 cité précédemment) a été obtenu selon les méthodes de clonage connues de l'homme du métier à partir des séquences dont les informations sont disponibles dans Genbank : la séquence U02622 de 1641 nucléotides codant pour une lipase 1 de *Geotrichum candidum*- souche ATCC 34614 a été placée sous contrôle de la séquence nucléotidique promotrice PGEA1 d'*Arabidopsis thaliana* (Z11158, 1659 nucléotides) et fusionnée au terminateur Nos, dans un plasmide pBluescript.

20

25

Comme décrit au point d) de l'exemple 2 § 2.1, le fragment obtenu ci-dessus a été ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 au gène codant pour l'oxalate oxydase dans un vecteur binaire pBIN19 pour l'étape de transformation.

30

5-2 Transformation et sélection

La transformation du colza est réalisée selon le protocole décrit à l'exemple 1 à l'aide du vecteur dérivé de pBIN19 décrit ci-dessus et la sélection des transformants est réalisée dès la formation des racines, selon l'une des
5 méthodes décrites à l'exemple 1 ou l'exemple 4.

Les résultats montrent qu'il est possible, selon le système de révélation immédiate au stade racine de l'invention, de sélectionner très tôt des transformants qui expriment normalement le gène d'intérêt à un stade tardif du développement (graine) ou dans organe végétatif autre que celui sur lequel la sélection a été
10 réalisée.

Des plantes de tabac, tomate et chou-fleur peuvent également être obtenues selon un protocole semblable.

TABEAU I
Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de plantes de colza transformées

Milieu Composition (mg/l)	A	B	D	RCC	F	G
NH ₄ NO ₃	1 650		200	1 650	1 650	825
KNO ₃	1 900	2 500	1 250	1 900	1 900	950
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	67			
NaH ₂ PO ₄		150	75			
KH ₂ PO ₄	170		35	170	170	85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	750	525	440	440	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	250	370	370	185
H ₃ BO ₃	12,4	3	12,4	12,4	6,2	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	33,6	10	33,6	33,6	22,3	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	21	2	21	21	8,6	8,6
KI	1,66	0,75	1,66	1,66	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05	0,025	0,05	0,05	0,025	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05	0,025	0,05	0,05	0,025	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	22,24	27,8	27,8	27,8	27,8	22,24
Na ₂ EDTA	29,84	37,3	37,3	37,3	37,3	29,84
Inositol	100	100	100	100	100	100
Acide nicotinique	0,5	1	1	0,5	1	0,5

TABLEAU 1 (suite 1)

Milieu Composition (mg/l)	A	B	D	RCC	F	G
Pyridoxine HCl	0,5	1	1	0,5	1	0,5
Thiamine		10	10		10	
Glycine	2			2		2
Glucose	10 000	20 000				10 000
Saccharose	10 000		20 000	10 000	10 000	
D-mannitol		70 000		10 000		
H.A.A.		1		1	0,1	0,01
B.A.		1		0,5	0,5	
2,4D		0,25	3			
Adénine sulfate			30			
I.P.A.				0,5		
GA				0,02		
Tween 80		10				
Agar	8 000			8 000	8 000	8 000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Gentamicine (sulfate)	10					

NAA : acide naphthalène acétique

BA : acide benzyl-6-aminopurine

2,4D : acide dichloro-2,4-phénoxyacétique

IPA : N⁶-(Δ^2 Iso-pentenyl)adénineGA₃ : acide gibbérellique

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

TABLEAU 2
Composition du milieu de culture M utilisé pour la culture des racines transformées de tournesol

	Composition mg/l
NH_4NO_3	330
KNO_3	380
KH_2PO_4	170
MgSO_4	370
CaCl_2	440
H_3BO_3	6,3
$\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1,6
KI	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Pyridoxine HCl	0,1
Acide nicotinique	0,1
Glycine	0,4
Inositol	20
Thiamine	0,02
Saccharose	30 000
Citrate de fer	200

REVENDICATIONS

1- Procédé d'obtention de plantes transgéniques exprimant une protéine à activité productrice de H_2O_2 , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
5 suivantes de :

(a) transformation de cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes* contenant un vecteur porteur d'un gène codant pour une protéine productrice de H_2O_2 dans un contexte qui permet son expression dans le végétal ;

(b) sélection des transformants qui contiennent et expriment ce gène
10 par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(c) régénération des plantes à partir des racines sélectionnées et contrôle de l'expression des plantules obtenues par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(d) tri phénotypique et éventuellement analyse moléculaire de la
15 descendance des plantes transgéniques, permettant la sélection ou la confirmation des plantes transgéniques obtenues contenant seulement le transgène et non l'ADN-T propre à *A. rhizogenes*.

2-Procédé d'obtention de plantes transgéniques exprimant un gène d'intérêt et un gène codant pour une protéine à activité productrice de
20 H_2O_2 , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes de :

(a) transformation de cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes* contenant un ADN recombinant comprenant à la fois un gène codant la protéine productrice de H_2O_2 et un gène codant pour une protéine d'intérêt dans un contexte permettant leur expression dans le végétal ;

(b) sélection des transformants qui contiennent le gène codant pour la
25 protéine d'intérêt par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(c) régénération de plantes à partir des transformants sélectionnés et contrôle de l'expression des plantules obtenues par un test colorimétrique à la peroxydase ;

(d) tri selon le phénotype et éventuellement analyse moléculaire de la descendance des plantes transgéniques pour sélectionner ou confirmer les plantes contenant seulement le transgène et non l'ADN-T propre à *A. rhizogenes*.

(e) purification, le cas échéant de la protéine d'intérêt produite.

5 3- Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le test colorimétrique à l'étape (b) est effectué sur un échantillon de la racine.

4- Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le test colorimétrique à l'étape (b) est effectué sur milieu liquide d'incubation après élimination des agrobactéries.

10 5- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le test colorimétrique à l'étape (b) est effectué sur l'empreinte laissée par les explants transformés sur un milieu gélosé ou sur une membrane.

6- Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la sélection à l'étape (b) est réalisée en présence d'une concentration saturante en
15 substrat.

7- Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la concentration saturante en substrat est comprise entre 5 et 50 mM.

8- Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le test colorimétrique à l'étape (c) est effectué sur un échantillon de tissu végétal des
20 plantules obtenues.

9- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le gène d'intérêt est un gène d'intérêt qui s'exprime à un stade tardif du développement.

10- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les cellules végétales sont des cellules végétales provenant d'une espèce
25 de grande culture choisie parmi le colza, le chou-fleur, le tournesol, le blé, le maïs, l'orge, le tabac, ou d'une espèce potagère telle que la tomate.

11- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les cellules végétales sont des cellules de cotylédons, d'hypocotyles ou de hampes florales.

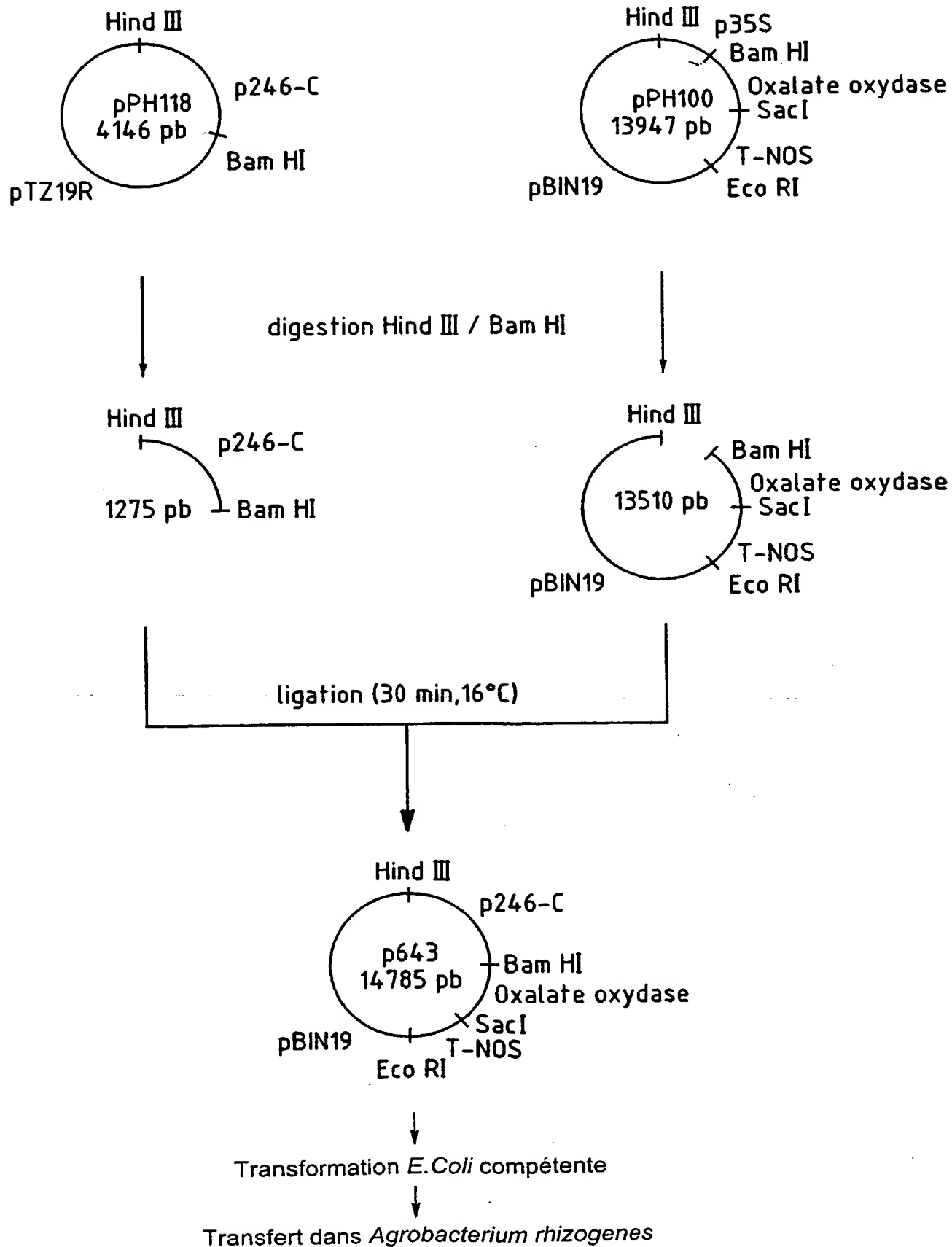
12- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les cellules végétales ne produisent pas d'oxalate oxydase de façon endogène.

5 13- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la protéine d'intérêt est une endochitinase.

14- Parties de plantes et/ou plantes susceptibles d'être obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 13.

10 15- Parties de plantes et/ou plantes selon la revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi le colza, le chou-fleur, le tournesol, le blé, le maïs, l'orge, le tabac et la tomate.

1/1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/FR 99/02412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HATAMOTO, H., ET AL.: "Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with Agrobacterium rhizogenes and a binary vector plasmid" PLANT CELL REPORTS, vol. 9, 1990, pages 88-92, XP002107166 the whole document	1-3, 8, 10-15
Y	WO 94 13790 A (SANOFI ELF ;ELF AQUITAINE (FR); PIGNARD ANNIE (FR); GREZES BESSET) 23 June 1994 (1994-06-23) cited in the application page 8, line 1 - line 21	1-3, 8, 10-15
A	EP 0 262 972 A (PLANT CELL RES INST) 6 April 1988 (1988-04-06) page 6 -page 8	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 2000

Date of mailing of the international search report

16/03/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Maddox, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02412

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOULTER M E ET AL: "TRANSFORMATION OF BRASSICA NAPUL L.(OILSEED RAPE) USING AGROBACTERIUM TUMEFACIENS AND AGROBACTERIUM RHIZOGENES - A COMPARISON" PLANT SCIENCE, vol. 70, 1990, pages 91-99, XP000775906 ISSN: 0168-9452 the whole document	1-15
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 December 1994 (1994-12-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 276934, WEBB, K. J, ET AL.: "Expression of GUS in primary transformants and segregation patterns of GUS, TL- and TR-DNA in the T1 generation of hairy root transformants of Lotus corniculatus" XP002107276 abstract & TRANSGENIC RES. (1994), 3(4), 232-40,	1-15
A	SHAHIN, E.A., ET AL.: "Transformation of cultivated tomato by a binary vector in Agrobacterium rhizogenes: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA" THEOR. APPL. GENET., vol. 72, no. 6, 1986, pages 720-777, XP002107167 cited in the application the whole document	1-15
A	SIMPSON, R.B., ET AL.: "A disarmed binary vector from Agrobacterium tumefaciens functions in Agrobacterium rhizogenes" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 6, 1986, pages 403-415, XP002107168 the whole document	1-15
A	WO 97 37012 A (KEESE PAUL KONRAD ;SURIN BRIAN PETER (AU); SHAHJAHAN ALI (AU); UNI) 9 October 1997 (1997-10-09) the whole document	1-15
A	EP 0 716 147 A (JUJO PAPER CO LTD) 12 June 1996 (1996-06-12) the whole document	1-15
A	EP 0 687 730 A (JAPAN TOBACCO INC) 20 December 1995 (1995-12-20) the whole document	1-15
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 99/02412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG Z ET AL: "Germin-like oxalate oxidase, a H2O2-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus" PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 1, 1995, pages 139-145, XP002084833 ISSN: 0960-7412 page 144, left-hand column	5
A	WO 92 01792 A (ELF AQUITAINE ; SANOFI SA (FR)) 6 February 1992 (1992-02-06) cited in the application examples 8-11, 13	13
A	DATABASE SCISEARCH 'Online! AN 96:394736, GRISON, R., ET AL.: "FIELD TOLERANCE TO FUNGAL PATHOGENS OF BRASSICA-NAPUS CONSTITUTIVELY EXPRESSING A CHIMERIC CHITINASE GENE" XP002107279 abstract & NATURE BIOTECHNOLOGY, (MAY 1996) VOL. 14, NO. 5, PP. 643-646.,	13
T	WO 98 51806 A (PIONEER HI BRED INT ; WANG LIJUAN (US); BIDNEY DENNIS L (US); SCELO) 19 November 1998 (1998-11-19) the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02412

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9413790 A	23-06-1994	AU 5653294 A CA 2151146 A EP 0672124 A	04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995
EP 0262972 A	06-04-1988	AU 8151887 A JP 2503263 T WO 8802405 A	21-04-1988 11-10-1990 07-04-1988
WO 9737012 A	09-10-1997	AU 2143797 A CA 2250111 A EP 0922097 A	22-10-1997 09-10-1997 16-06-1999
EP 0716147 A	12-06-1996	JP 9154580 A AU 703485 B AU 3855795 A BG 101524 A BR 9509715 A CA 2162449 A CN 1137565 A CZ 9701388 A FI 971961 A HU 77074 A WO 9615252 A NO 972108 A NZ 295256 A PL 320201 A SK 56997 A US 5965791 A	17-06-1997 25-03-1999 06-06-1996 30-01-1998 28-10-1997 10-05-1996 11-12-1996 18-02-1998 07-07-1997 02-03-1998 23-05-1997 07-07-1997 29-04-1999 15-09-1997 06-05-1998 12-10-1999
EP 0687730 A	20-12-1995	AU 1121395 A US 5731179 A AU 8929898 A WO 9516031 A	27-06-1995 24-03-1998 03-12-1998 15-06-1995
WO 9201792 A	06-02-1992	FR 2665177 A AU 656907 B AU 8302791 A CA 2067176 A EP 0493581 A JP 5501807 T NZ 239116 A US 5859340 A US 5932698 A	31-01-1992 23-02-1995 18-02-1992 25-01-1992 08-07-1992 08-04-1993 27-07-1993 12-01-1999 03-08-1999
WO 9851806 A	19-11-1998	AU 7479298 A	08-12-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. Internationale No

PCT/FR 99/02412

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/82 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HATAMOTO, H., ET AL.: "Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with Agrobacterium rhizogenes and a binary vector plasmid" PLANT CELL REPORTS, vol. 9, 1990, pages 88-92, XP002107166 le document en entier	1-3, 8, 10-15
Y	WO 94 13790 A (SANOFI ELF ;ELF AQUITAINE (FR); PIGNARD ANNIE (FR); GREZES BESSET) 23 juin 1994 (1994-06-23) cité dans la demande page 8, ligne 1 - ligne 21	1-3, 8, 10-15
A	EP 0 262 972 A (PLANT CELL RES INST) 6 avril 1988 (1988-04-06) page 6 -page 8	1-15

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BOULTER M E ET AL: "TRANSFORMATION OF BRASSICA NAPUL L.(OILSEED RAPE) USING AGROBACTERIUM TUMEFACIENS AND AGROBACTERIUM RHIZOGENES - A COMPARISON" PLANT SCIENCE, vol. 70, 1990, pages 91-99, XP000775906 ISSN: 0168-9452 le document en entier	1-15
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 23, 5 décembre 1994 (1994-12-05) Columbus, Ohio, US; abstract no. 276934, WEBB, K. J, ET AL.: "Expression of GUS in primary transformants and segregation patterns of GUS, TL- and TR-DNA in the T1 generation of hairy root transformants of Lotus corniculatus" XP002107276 abrégé & TRANSGENIC RES. (1994), 3(4), 232-40,	1-15
A	SHAHIN, E.A., ET AL.: "Transformation of cultivated tomato by a binary vector in Agrobacterium rhizogenes: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA" THEOR. APPL. GENET., vol. 72, no. 6, 1986, pages 720-777, XP002107167 cité dans la demande le document en entier	1-15
A	SIMPSON, R.B., ET AL.: "A disarmed binary vector from Agrobacterium tumefaciens functions in Agrobacterium rhizogenes" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 6, 1986, pages 403-415, XP002107168 le document en entier	1-15
A	WO 97 37012 A (KEESE PAUL KONRAD ; SURIN BRIAN PETER (AU); SHAHJAHAN ALI (AU); UNI) 9 octobre 1997 (1997-10-09) le document en entier	1-15
A	EP 0 716 147 A (JUJO PAPER CO LTD) 12 juin 1996 (1996-06-12) le document en entier	1-15
A	EP 0 687 730 A (JAPAN TOBACCO INC) 20 décembre 1995 (1995-12-20) le document en entier	1-15
	— -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02412

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ZHANG Z ET AL: "Germin-like oxalate oxidase, a H2O2-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus" PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 1, 1995, pages 139-145, XP002084833 ISSN: 0960-7412 page 144, colonne de gauche</p>	5
A	<p>WO 92 01792 A (ELF AQUITAINE ; SANOFI SA (FR)) 6 février 1992 (1992-02-06) cité dans la demande exemples 8-11, 13</p>	13
A	<p>DATABASE SCISEARCH 'Online! AN 96:394736, GRISON, R., ET AL.: "FIELD TOLERANCE TO FUNGAL PATHOGENS OF BRASSICA-NAPUS CONSTITUTIVELY EXPRESSING A CHIMERIC CHITINASE GENE" XP002107279 abrégé & NATURE BIOTECHNOLOGY, (MAY 1996) VOL. 14, NO. 5, PP. 643-646.,</p>	13
T	<p>WO 98 51806 A (PIONEER HI BRED INT ; WANG LIJUAN (US); BIDNEY DENNIS L (US); SCELO) 19 novembre 1998 (1998-11-19) le document en entier</p>	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Formulaire Internationale No

PCT/FR 99/02412

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9413790	A	23-06-1994	AU 5653294 A CA 2151146 A EP 0672124 A	04-07-1994 23-06-1994 20-09-1995
EP 0262972	A	06-04-1988	AU 8151887 A JP 2503263 T WO 8802405 A	21-04-1988 11-10-1990 07-04-1988
WO 9737012	A	09-10-1997	AU 2143797 A CA 2250111 A EP 0922097 A	22-10-1997 09-10-1997 16-06-1999
EP 0716147	A	12-06-1996	JP 9154580 A AU 703485 B AU 3855795 A BG 101524 A BR 9509715 A CA 2162449 A CN 1137565 A CZ 9701388 A FI 971961 A HU 77074 A WO 9615252 A NO 972108 A NZ 295256 A PL 320201 A SK 56997 A US 5965791 A	17-06-1997 25-03-1999 06-06-1996 30-01-1998 28-10-1997 10-05-1996 11-12-1996 18-02-1998 07-07-1997 02-03-1998 23-05-1997 07-07-1997 29-04-1999 15-09-1997 06-05-1998 12-10-1999
EP 0687730	A	20-12-1995	AU 1121395 A US 5731179 A AU 8929898 A WO 9516031 A	27-06-1995 24-03-1998 03-12-1998 15-06-1995
WO 9201792	A	06-02-1992	FR 2665177 A AU 656907 B AU 8302791 A CA 2067176 A EP 0493581 A JP 5501807 T NZ 239116 A US 5859340 A US 5932698 A	31-01-1992 23-02-1995 18-02-1992 25-01-1992 08-07-1992 08-04-1993 27-07-1993 12-01-1999 03-08-1999
WO 9851806	A	19-11-1998	AU 7479298 A	08-12-1998

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire H25445MLG1FD	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02412	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/10/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 09/10/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant BIOGEMMA et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☒ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 26/04/2000	Date d'achèvement du présent rapport 29.01.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Celler, J N° de téléphone +49 89 2399 7336 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

Revendications, N°:

1-15 version initiale

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02412

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1 - 13
	Non : Revendications 14 et 15
Activité inventive	Oui : Revendications 1 - 13
	Non : Revendications 14 et 15
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1 - 15
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

La présente demande de brevet concerne un procédé d'obtention de plantes transgéniques. Le procédé de la demande utilise la sélection des plantes transformées qui expriment un gène codant pour une protéine à activité productrice de H_2O_2 par un test colorimétrique à la peroxydase. Les parties de plantes et/ou plantes, caractérisées en ce qu'elles expriment un gène codant pour une protéine d'intérêt, sont susceptibles d'être obtenues par le procédé selon la présente demande. La protection est aussi demandée pour les parties de plantes et les plantes.

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 94 13790 A (SANOFI ELF ;ELF AQUITAINE (FR); PIGNARD ANNIE (FR); GREZES BESSET) 23 juin 1994 (1994-06-23) cité dans la demande
- D2: ZHANG Z ET AL: 'Germin-like oxalate oxidase, a H_2O_2 -producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus' PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 1, 1995, pages 139-145, XP002084833 ISSN: 0960-7412

L'objet des revendications 14 et 15 concerne des parties de plantes transgéniques et des plantes transgéniques. Les parties de plantes transgéniques et les plantes transgéniques de la présente invention sont susceptibles d'être obtenues par un procédé de sélection qui utilise l'activité enzymatique productrice de H_2O_2 , par exemple l'oxalate oxydase. Cela concerne celles contenant un ADN recombinant comprenant un gène d'intérêt, par exemple endochitinase et/ou le gène codant pour la protéine enzymatique productrice de H_2O_2 .

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Le document antérieur D1 décrit une utilisation de l'oxalate oxydase dans un système de pression sélective des transformantes. Les parties de plantes transgéniques et les plantes transgéniques sont susceptibles d'être obtenues par le système de pression sélective de D1 contenant un ADN recombinant comprenant un gène d'intérêt, endochitinase et/ou le gène codant pour l'oxalate oxydase. (Exemple, p. 28, "Mise en évidence de l'expression de la protéine à activité endochitinase dans les tabacs transgénique sélectionnée sur acide oxalique"). Les parties de plantes transgénique et les plantes transgéniques constituant l'objet des présentes revendications 14 et 15 sont donc identiques à celles qui sont décrites dans D1. Les revendications ne sont donc pas considérées comme nouvelles (article 33(2) PCT).

L'objet des revendications 1 - 13 concerne un procédé d'obtention de plantes transgéniques. Le procédé utilise la sélection des plantes transformantes qui expriment un gène codant pour une protéine à activité productrice de H_2O_2 par un test colorimétrique à la peroxydase. D1 décrit un procédé d'obtention des plantes transgéniques qui utilise l'activité enzymatique productrice de H_2O_2 . Mais, l'objet des revendications 1 - 13 diffère de celui de D1: le procédé selon D1 utilise, pour sélectionner des cellules transgéniques, l'activité enzymatique susceptible de dégrader l'acide oxalique et n'utilise pas de test colorimétrique à l'activité enzymatique productrice de H_2O_2 . Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant une mise à disposition alternative de procédé d'obtention des plantes transgéniques. Le procédé de la présente invention est un procédé avantageux comme est décrit à la page 3 de la présente demande de brevet. Bien que D2 décrit un test colorimétrique à la peroxydase, les documents antérieur, D1 et D2, n'encourageaient pas l'homme du métier à utiliser un test colorimétrique pour la sélection des plantes transformées. Donc, l'objet des revendications 1 - 13 est considéré comme nouveau et inventif selon article 33(2) et (3) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPAREE

Demande internationale n° PCT/FR99/02412

Concernant le point VI

Certains documents cités

Certains documents publiés (règle 70.10)

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
WO 98/51806	19.11.98	11.05.98	16.05.97

Ledit document a été déposé avant la date de priorité de la demande mais publié après. Il ne constitue donc pas un état antérieur de la technique au sens de la Règle 64(1)(b) PCT. Cependant, il pourra être pris en compte, au cours de la phase régionale, pour déterminer si l'objet, pour lequel la protection est revendiquée, est nouveau. Si la priorité de la demande se révèle ne pas être valide, ledit document sera aussi utilisé pour apprécier l'activité inventive.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H25445MLG1FD	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02412	International filing date (day/month/year) 08 October 1999 (08.10.99)	Priority date (day/month/year) 09 October 1998 (09.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
RECEIVED JUL 20 2001 TECH CENTER 1600/2900		
Applicant BIOGEMMA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26 April 2000 (26.04.00)	Date of completion of this report 29 January 2001 (29.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02412

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-15, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02412**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims	14 and 15	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims	14 and 15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present patent application concerns a method for obtaining transgenic plants. The method of the application selects transformed plants expressing a gene coding for a protein having H₂O₂-producing activity by a peroxidase colorimetric test. Plant parts and/or plants, characterised in that they express a gene coding for a protein of interest, can be obtained by the method as per the present application. Protection is also requested for the plant parts and the plants.

The following documents are referred to:

D1: WO 94 13790 A (SANOFI ELF; ELF AQUITAINE (FR); PIGNARD ANNIE (FR); GREZES BESSET) 23 June 1994 (1994-06-23), cited in the application

D2: ZHANG Z ET AL: "Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus" PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 1, 1995, pages 139 to 145, XP002084833 ISSN: 0960-7412

The subject matter of Claims 14 and 15 concerns transgenic plant parts and transgenic plants. The transgenic plant

THIS PAGE BLANK (USPTO)

parts and the transgenic plants of the present invention can be obtained by a selection method which uses the H_2O_2 -producing enzymatic activity, for example, of oxalate oxidase. It concerns those which contain a recombinant DNA comprising a gene of interest, for example endochitinase and/or the gene coding for the enzymatic protein producing H_2O_2 .

Prior document D1 describes a use of oxalate oxidase in a system of selectively pressing transformants. The transgenic plant parts and the transgenic plants can be obtained by the selective pressing system of D1 containing a recombinant DNA comprising a gene of interest, endochitinase and/or the gene coding for oxalate oxidase. (Example, p. 28, "Revealing the expression of the protein with endochitinase activity in transgenic tobaccos, selected on oxalic acid"). The transgenic plant parts and the transgenic plants which are the subject matter of the present Claims 14 and 15 are thus identical to those described in D1. The claims are therefore not considered to be novel (PCT Article 33 (2)).

The subject matter of Claims 1 to 13 concerns a method for obtaining transgenic plants. The method uses the selection by a peroxidase colorimetric test of transformant plants which express a gene coding for a protein having H_2O_2 -producing activity. D1 describes a method for obtaining transgenic plants using the H_2O_2 -producing enzymatic activity. But the subject matter of Claims 1 to 13 differs from that of D1: to select transgenic cells, the method as per D1 uses the enzymatic activity capable of breaking down oxalic acid and does not use a colorimetric test for the H_2O_2 -producing enzymatic activity. The problem which the present invention sets out to solve may therefore be considered to be that of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

providing an alternative method for obtaining transgenic plants. The method of the present invention is advantageous as described on page 3 of the present patent application. Although D2 does describe a peroxidase colorimetric test, the prior documents, D1 and D2, did not encourage a person skilled in the art to use a colorimetric test for selecting transformed plants. Therefore, the subject matter of Claims 1 to 13 is considered to be novel and inventive as per PCT Article 33(2) and (3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02412

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
WO 98/51806	19 November 1998 (19.11.1998)	11 May 1998 (11.05.1998)	16 May 1997 (16.05.1997)

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>
---------------------------------------	--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)